Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

Studien über die Beziehung zwischen Wachstum und Toxinproduktion bei Corynebacterium (C.) Pyogenes

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Winfriede Sauer
Tierärztin aus Leipzig

Berlin 1966
Journal-Nr. 527

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

STUDIEN ÜBER DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN WACHSTUM UND TOXINPRODUKTION BEI CORYNEBACTERIUM (C.) PYOGENES

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Winfriede Sauer
Tierärztin aus Leipzig

Berlin 1966
Journal-Nr. 527

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. J. Boch
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Tag der Promotion: 10. 2. 1966

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 1

Literatur 3

Eigene Untersuchungen 14

A. Material und Methoden
   1. Stämme
   2. Nährbodenbereitung und -beimpfung
   3. Toxingewinnung
   4. Toxinauswertung

B. Ergebnisse der Toxinbestimmungen nach Kultivierung in:
   1. Lovellscher Bouillon 23
      a) unter Verwendung von Brunnengräber-Pepton
      b) unter Verwendung anderer Peptone:
         Proteose-Pepton
         Bacto-Pepton
         pankreatisch verdautes Casein-Hydrolysat
   2. Todd-Hewitt-Bouillon 27
      a) ohne Frischfleischzusatz
      b) mit Frischfleischzusatz
   3. Thioglykolat 29
      a) ohne Serumzusatz
      b) mit Serumzusatz
   4. Lovellscher Bouillon mit Veränderung des pH-Wertes 30

C. Vergleich der Wachstumskurve und des Toxinbildungsvermögens eines guten und schlechten Toxinbildners 33

Besprechung der Ergebnisse 38

Zusammenfassung 42

Literaturverzeichnis 43

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535704_0074

Einleitung:

Die Frage des Infektionsweges und der pathogenen Wirkung des Corynebacterium (C.) pyogenes ist nicht eindeutig geklärt. Bekannt ist lediglich, daß der Keim in eitrigen Prozessen bei zahlreichen Tierspezies und beim Menschen nachweisbar ist und als spezifischer Eitererreger, namentlich beim Rind umd Schwein, gilt.

Aus Tierversuchen, bei denen eine fortschreitende Schwächung des Organismus festzustellen war, folgerte BILAL (1), daß ein Toxin von dem Keim gebildet wird. Der Autor konnte eine toxische Fraktion aus Bakterienautolysaten isolieren, die pathogen auf Kaninchen wirkte.

LOVELL (7) gelang es, das Toxinbildungsvermögen von C. pyogenes durch quantitative Testung zu beweisen. Er untersuchte die Wirkungsweise des Toxins an Kaninchen-Erythrozyten und an Mäusen und warf dabei die Frage auf, ob die Bildung des Toxins eine Rolle bei den pathogenen Vorgängen im Organismus spielt.

Spätere Untersuchungen von HARTWIGK (3) an mehreren Stämmen des C. pyogenes ergaben eine in der Stärke unterschiedliche Toxinproduktion.

Da die Frage, ob die Stärke des Toxinbildungsvermögens eine Eigenschaft der einzelnen Stämme ist oder durch Einflüsse des Nährmediums, auf dem die Keime vermehrt werden, bestimmt wird, bisher einer umfangreicheren Untersuchung nicht unterzogen werden konnte, wurde mir die Aufgabe übertragen festzustellen, ob die Fähigkeit der Toxinproduktion eine individuelle Leistung des einzelnen Stammes ist oder durch Modifikation des Nährmediums geändert werden kann.

Dabei ging ich in der Weise vor, daß ich zunächst Stämme auf einem gleichartigen Nährboden auf ihre Toxinbildung hin prüfte, um die Fähigkeit der einzelnen Stämme, Toxin zu produzieren, kennenzulernen. Durch Auswahl verschiedener günstig erscheinender Nährbodenarten und durch Änderung der gleichen Nährbodenart durch Verwendung verschiedener

Peptone sollte versucht werden, die Toxinproduktion der untersuchten Stämme zu beeinflussen. Sofern die Versuche ergaben, daß die Fähigkeit der Toxinbildung eine Eigenschaft des einzelnen Stammes war, sollte weiterhin geprüft werden, ob die Toxinbildung von der Fähigkeit des Stammes, sich schnell zu vermehren, abhängig ist.

Literatur:

In seinen unveränderlichen Eigenschaften ist C. pyogenes ausreichend charakterisiert. Morphologisch handelt es sich um ein unbewegliches, grampositives und pleomorphes Stäbchen. Auf Frischblutagar wachsen die Kolonien mit ß-Hämolyse, das Wachstum auf Nährböden ohne Serumzusatz ist geringer als auf Nährböden mit Serumzusatz. Der Keim verflüssigt Gelatine, säuert Lackmusmilch, bringt sie zur Gerinnung und peptonisiert das Milchgerinnsel. Indol und Schwefelwasserstoff werden nicht gebildet, Harnstoff wird nicht gespalten und Nitrate werden nicht zu Nitriten reduziert. In seinem Vergärungsgepräge verhält sich C. pyogenes gegenüber Salizin, Raffinose und Inulin inaktiv, Glukose und Laktose werden stets gespalten, gegenüber Saccharose, Maltose, Galaktose, Laevulose und Trehalose ist sein Verhalten wechselnd.

Außer dem morphologischen und kulturellen Verhalten von C. pyogenes und seinem Vergärungsgepräge waren die serologischen Eigenschaften des Keimes Gegenstand verschiedener Untersuchungen.

BROWN und ORCUTT (2) stellten von 4 Stämmen durch Immunisierung von Kaninchen Antiseren her und beobachteten, daß jeder Stamm mit jedem Serum präzipitierte. Aus diesem Ergebnis schlossen die Autoren auf die Gleichheit der Stämme in ihrer antigenen Struktur.

MERCHANT (12) immunisierte Kaninchen mit 2 von 5 C. pyogenes-Stämmen und agglutinierte mit diesen 2 Antiseren die 5 Stämme. Alle Agglutinationsversuche verliefen positiv. MERCHANT nahm daher an, daß die untersuchten Stämme gleiche antigene Eigenschaften besitzen.

Die neueren Untersuchungen von RYFF und BROWNE (14) bestätigten zwischen einzelnen Stämmen von C. pyogenes enge Beziehungen in der Antigenstruktur. Sie prüften 10 Stämme mittels der Agglutination mit den von Kaninchen gewonnenen Antiseren und wiesen aufgrund der Kreuzreaktionen auf die enge Verwandtschaft innerhalb der Stämme hin. Zur Bestätigung

dieser Annahme bezogen die Autoren die Agglutinin-Absorption in ihre Untersuchungen mit ein und stellten fest, daß die Agglutinine des Antiserums eines Stammes von mehreren anderen Stämmen absorbiert wurden, so daß der eigene Stamm nicht mehr agglutiniert werden konnte.

MATTHEWS und DERBYSHIRE (11) stellten von 9 C. pyogenes-Stämmen durch Immunisierung von Kaninchen Antiseren her und untersuchten diese gegenüber Lancefield- und Fuller-extrakten von 50 Stämmen. Sämtliche Reaktionen fielen positiv aus. Nach Absorption jedes der 9 Antiseren durch die Zellen oder Extrakte eines jeden der 9 Stämme reagierte jedes Serum gegenüber sämtlichen Extrakten negativ.

Während alle bisher genannten Autoren keine Unterschiede in der Antigen-Struktur ihrer untersuchten Stämme feststellen konnten, war es LOVELL (7), der bei 5 von 33 untersuchten Stämmen eine abweichende Antigenstruktur nachwies. Diese 5 Stämme hatten mit den übrigen 28 Stämmen ein Antigen gemeinsam, besaßen aber darüber hinaus ein weiteres Antigen. Weitere Untersuchungen über die doppelte Antigenstruktur dieser 5 Stämme wurden nicht unternommen, der Autor führte das Vorhandensein zweier Antigene auf häufiges Subkultivieren und damit auf eine mögliche Degeneration der Stämme zurück.

Nachdem HARTWIGK und GRUND (4) Varianten von C. pyogenes nachgewiesen hatten, die morphologisch und kulturell mit C. pyogenes übereinstimmten, aber keine Gelatine verflüssigten, wurde das serologische Verhalten dieser Varianten einer näheren Untersuchung unterzogen. Mittels der Präzipitation und der Komplementbindungsreaktion ergaben Kreuzreaktionen zwischen den Antigenen der typischen Stämme und der gefundenen Varianten und den durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenen Antiseren eine enge Antigenverwandtschaft.
Da die Varianten morphologisch, kulturell und auch serologisch dem typischen C. pyogenes gleichen, wurden sie als "atypische" C. pyogenes-Stämme bezeichnet, die sich von den typischen Stämmen allein durch die fehlende Gelatinasebildung unterscheiden.

Die Möglichkeit, aus Kulturen von C. pyogenes eine toxische Fraktion zu isolieren, wurde zuerst von JOWETT (6) geprüft. Er kultivierte C. pyogenes 6 Wochen lang bei 37,5° C in 10 %iger Serumbouillon, zentrifugierte die Kultur hochtourig und verimpfte den klaren Überstand subkutan an Kaninchen. Da selbst hohe Dosen keine erkennbare Erkrankung auslösten, folgerte JOWETT, daß der Keim kein lösliches Ektotoxin zu bilden vermag. Andererseits fand er eine Hämolysinwirkung in Blut-Bouillonröhrchen, die mit C. pyogenes beimpft waren.

Später versuchte BILAL (1) die Abtrennung eines Toxins von den Bakterien. Dazu wurden nach 8-stündiger Bebrütung die Bakterienleiber einer Bouilloncharge von 200 ml durch Zentrifugation gewonnen, in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in 40 ml physiologische Kochsalzlösung suspendiert. Zu dieser Lösung goß der Autor 4 ml Chloroform und ließ es 48 Stunden einwirken. Die überstehende Flüssigkeit enthielt das Toxin von C. pyogenes.
Nach intravenöser Applikation von 2 ml dieses toxischen Überstandes starb ein Kaninchen von 1600 g innerhalb von 48 Stunden; eine intramuskuläre Injektion der gleichen Dosis rief eine lokale Entzündung hervor, die spontan abheilte. Mit einer intramuskulären oder intraperitonealen Injektion von 1 ml des Toxins konnte bei Mäusen keine Erkrankung hervorgerufen werden.

1937 untersuchte LOVELL (7) die Toxinbildung von C. pyogenes in verschiedener Richtung. Zunächst züchtete er Pyogenes-Bakterien in Kalbsbrühe und gewann nach 48-stündiger Bebrütung bei 37,5° C durch Zentrifugation der Kulturen eine toxische Fraktion, die auf rote Blutkörperchen verschiedener Tiere hämolysierend wirkte. Die Menge des gebildeten Toxins war jedoch gering und konnte durch Filtration nicht von den Bakterienzellen getrennt werden.

Die Erzeugung eines filtrierbaren Toxins gelang LOVELL in gekochter Fleischbrühe, wobei die Flaschen mit einem Paraffinstopfen verschlossen wurden. Nach 48-stündiger Bebrütung bei 37,5° C wurde der flüssige Inhalt der Flaschen durch Seitzfilter gegeben und das Filtrat gegenüber Erythro-

zyten von Ochsen, Schafen und Kaninchen auf seine toxische Wirkung getestet. Außerdem wurde dieses Filtrat Mäusen und Kaninchen intravenös injiziert. Anhand der Ergebnisse konnte LOVELL beweisen, daß von C. pyogenes-Kulturen gewonnene bakterienfreie Filtrate ein Toxin besitzen, welches Erythrozyten zu hämolysieren vermag und bei intravenöser Applikation für Mäuse und Kaninchen tödlich ist. Die hämolytische Wirkung des Filtrates konnte besonders gut gegenüber Kaninchen-Erythrozyten festgestellt werden, da diese die größte Sensibilität aufwiesen.

Da C. pyogenes in gekochter Fleischbrühe nur wenig Toxin bildete, versuchte LOVELL in einer weiteren Arbeit (8) das Nährmedium zu ändern, um eine größere Toxinausbeute zu erzielen. Er konnte die Toxinbildung verbessern, wenn die Fleischbrühe anstelle von Leitungswasser mit destilliertem Wasser hergestellt wurde. Noch größere Toxinmengen konnten aus der Fleischbrühe gewonnen werden, wenn dieser frisches, zerkleinertes Fleisch zugesetzt wurde. Die bisher beste Toxinbildung konnte in einem Nährmedium erzielt werden, das sich aus Rinderherzbrühe und frischem, zerkleinerten, mageren Rindfleisch zusammensetzte.

Eine weitere Arbeit von LOVELL (9) befaßt sich mit der Gewinnung des Toxins von C. pyogenes nach Kultivierung in Milch. Dabei ließ sich das Toxin in ähnlicher Konzentration wie aus Rinderherzbrühe mit Fleischzusatz nachweisen. Der Gipfel der Toxinproduktion wurde nach 4 bis 5-tägiger Bebrütung erreicht. Der Verlust an Toxin war bei Filtration jedoch zu groß, so daß die Milch als Nährboden für eine Toxingewinnung aufgegeben wurde. Rinderherzwasser mit Zusatz von frischem zerkleinerten Rindfleisch, die sogenannte Lovellsche Bouillon, hat sich gegenüber anderen Nährsubstraten immer wieder als optimal für die Toxingewinnung von C. pyogenes erwiesen.

Nachdem es LOVELL gelungen war, ein filtrierbares Toxin von C. pyogenes zu gewinnen, wurde das Toxin auf Hitzeresistenz, Beeinflussung durch Chemikalien, wie Phenol und Formalin, Haltbarkeit bei Aufbewahrung, Verhalten gegenüber kleinen Versuchstieren, wie Kaninchen, Mäusen und

Meerschweinchen, Identität der hämolytischen und toxischen Wirkung und seine serologischen Eigenschaften näher untersucht.

LOVELL (7) teilte Filtrate von drei Stämmen und erhitzte je ½ Stunde bei 56° C und ½ Stunde bei 100° C. Nach der Erhitzung wurden die Filtrate im Hämolysetest ausgewertet. Durch die ½-stündige Erhitzung sowohl bei 56° C als auch bei 100° C hatten die Filtrate ihr Hämolysevermögen verloren.

Zu dem gleichen Ergebnis kam HARTWIGK (3), der Filtrate von 5 Stämmen auf ihre Temperaturempfindlichkeit prüfte. Die Filtrate wurden je ½ Stunde bei 37,5° C, 40° C, 56° C, 60° C und 65° C im Wasserbad erhitzt. Die Hämolysetiter der unerhitzten und der bei 37,5° C erhitzten Filtrate waren gleich hoch, die ½-stündige Erhitzung bei 40° C hatte den Titer deutlich reduziert und die ½-stündige Erhitzung bei 56° C hatte das Toxin vollständig inaktiviert.

MATTHEWS und DERBYSHIRE (11) kultivierten C. pyogenes-Stämme in Todd-Hewitt-Bouillon und in mit Fleischzusatz modifizierter Todd-Hewitt-Bouillon. Nach 48-stündiger Bebrütung wurden die Kulturen durch Seitz- und Membranfilter gegeben und die gewonnenen Filtrate bei 56° C ½ Stunde lang im Wasserbad erhitzt. Die Auswertung im Hämolysetest ergab die vollständige Inaktivierung der hämolytischen Aktivität der Seitz- und Membranfiltrate.

LOVELL (7) versetzte Filtrat mit 0,25 % Phenol und bewahrte die Mischung über Nacht im Eisschrank auf. Die anschließende Titrierung des Filtrates im Hämolysetest ergab bei einem Stamm keine Titerreduzierung, bei zwei anderen Stämmen fiel der Titer von 1:320 auf 1:160.

Ähnliche Ergebnisse beschrieben MATTHEWS und DERBYSHIRE (11). Mit 0,25 % Phenol versetztes Filtrat wurde nach 24 Stunden im Hämolysetest ausgewertet. Ein Filtrat zeigte einen Titerrückgang von 1:32 auf 1:16. Ein zweites Filtrat fiel im Titer von 1:512 auf 1:256, während ein drittes Filtrat den gleichen Hämolysetiter wie vor der Behandlung mit Phenol aufwies.

LOVELL (7), MATTHEWS und DERBYSHIRE (11) versetzten Filtrate mit 0,25 % Formalin und bewahrten die Mischung 18-24 Stunden bei 37,5° C auf. Die Auswertung der Filtrate im Hämolysetest ergab eine vollkommene Inaktivierung der hämolytischen Aktivität aller Filtrate.

HARTWIGK (3) untersuchte an Filtraten von 5 Stämmen den Einfluß des Formalins auf das Toxin. Den Filtraten wurde Formalin so zugesetzt, daß es im Gesamtvolumen 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 und 0,8 % betrug. Die Filtrate wurden 24 Stunden bei 37,5° C aufbewahrt. Nach Titrierung der Filtrate im Hämolysetest stellte er fest, daß 0,1 % Formalinzusatz nur einen geringen Titerverlust herbeiführte. Mit steigendem Formalingehalt kam es zu weiteren Titerverlusten. 0,8 % Formalin rief bei 3 von 5 Stämmen einen vollständigen Titerverlust hervor; der Titer des 4. Filtrates fiel von 1:128 auf 1:2, der Titer des 5. Filtrates von 1:1024 auf 1:8.

Während eines Zeitraumes von 35 Tagen konnte LOVELL (7) bei einem Filtrat einen Titerrückgang von 1:1280 auf 1:320 beobachten. Andere Filtrate zeigten über einen längeren Zeitraum nur eine geringe Titerreduzierung.

HARTWIGK (3) bewahrte die Filtrate von 2 Stämmen bei +5° C und -24° C bis zu 46 Tagen auf und untersuchte in dieser Zeit wiederholt die hämolytische Aktivität der Filtrate. Innerhalb dieses Zeitraumes konnte er eine geringe Minderung des Hämolysetiters beobachten, wobei aber der Titerrückgang nicht kontinuierlich war, sondern spontan zu verschiedenen Zeitpunkten der Beobachtung auftrat.

In einer seiner ersten Arbeiten bewies LOVELL (7) die tödliche Wirkung des Filtrates bei Mäusen und Kaninchen, wenn die Injektion intravenös erfolgte. Seine Versuche, mit subkutanen oder intradermalen Injektionen bei Meerschweinchen eine Reaktion zu beobachten, schlugen fehl.

In einer weiteren Arbeit gelang es LOVELL (9), die nekrotisierende Eigenschaft des Toxins von C. pyogenes zu beweisen. Die Injektion von 0,2 ml Filtrat in die depi-

lierte Haut eines Meerschweinchens rief an der Impfstelle einen nekrotischen Bezirk hervor, dessen Durchmesser von 0,2 bis 0,8 cm schwankte. Die gleiche Reaktion gelang auch mit getrocknetem Toxin, das durch Ausfällung mit Ammonsulfat gewonnen wurde.

LOVELL (7) immunisierte 6 Kaninchen mit aus 3 Stämmen hergestellten Filtraten, indem die Tiere 3 subkutane und 3 intravenöse Injektionen in einer Dosis von 0,5 bis 2,5 ccm Filtrat erhielten, entnahm in bestimmten Zeitabständen Blut und testete die Seren auf ihr Hemmungsvermögen gegenüber der hämolytischen und letalen Wirkung des Toxins. Dazu wurden die Seren ½ Stunde bei 56° C erhitzt und zu gleichen Teilen in einer 10 %igen Kochsalzlösung verdünnt. Zu jeder Probe wurden 0,5 ml Filtrat, welches ebenfalls in einer 10 %igen Kochsalzlösung gelöst war, gegeben. Die Mischungen wurden geschüttelt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur belassen. Dann wurden je 1 ccm einer 10 %igen Kaninchen-Erythrozyten-Suspension hinzugefügt und die Röhrchen 1 Stunde bei 37,5° C im Wasserbad belassen. Nach Herausnahme wurde abgelesen, bis zu welcher Verdünnung die Seren eine Hämolyse der roten Blutkörperchen zu hemmen vermochten.
Bei Stamm C 27 (Hämolysetiter 1:320) wurde die Hämolyse bis zum Titer von 1:160, bei Stamm P 1 (Hämolysetiter 1:1280) bis zum Titer von 1:640, bei Stamm G 1 (Hämolysetiter 1:1280) bis zum Titer von 1:160 gehemmt.
Um die Neutralisation der letalen Wirkung zu beweisen, wurden die Seren ½ Stunde bei 56° C erhitzt und in fallenden Mengen von 0,1, 0,02, 0,01 und 0,005 ccm mit einer konstanten Menge von 0,5 ccm Filtrat versetzt und intravenös an Mäuse verimpft. Dabei konnte folgendes festgestellt werden: je höher der antihämolytische Titer eines Serums im Hämolysehemmungstest lag, desto geringer war die Menge des Serums, die die letale Wirkung des Filtrates aufheben konnte. Bei Stamm C 27 (Titer im Hämolysehemmungstest 1:160) war es die zum Filtrat zugesetzte Menge von 0,1 ccm Serum, die 5 von 5 geimpften Mäusen schützte und bei Stamm P 1 (Titer im Hämolysehemmungstest 1:640) ge-

nügte die Menge von 0,01 ccm Serum zur Neutralisierung der letalen Wirkung des Filtrates bei allen injizierten Mäusen.

Auch die dermonekrotische Wirkung des Toxins ist nach LOVELL (9) spezifisch und kann durch Antitoxin verhütet werden.

HARTWIGK (3) versuchte, durch Neutralisation Unterschiede zwischen den Toxinen der typischen und atypischen Variante des C. pyogenes aufzuzeigen. 3 typische und 2 atypische Stämme wurden 72 Stunden in Lovellscher Bouillon kultiviert, eine Zeit, die sich für die Toxinausbeute als optimal erwies.
Im Neutralisationstest verhielten sich die Toxine der typischen und atypischen Stämme gegenüber homologen und heterologen Seren gleich. Die Toxine der beiden Typen wurden daher in Hinsicht auf ihre antigene Struktur für identisch gehalten.
Eine gleichzeitige Kultivierung und Titrierung im Hämolysetest von Listerien der Paterson-Typen, 2 Stämmen von Erysipelothrix muriseptica und 1 Stamm von C. pseudotuberculosis ovis erbrachte keinen Hämolysinnachweis.

Nachdem LOVELL (7) bewiesen hatte, daß Formalinzusatz zum Filtrat dessen hämolytische und toxische Eigenschaften inaktiviert, aber das Filtrat in seiner antigenen Wirkung nicht angreift, versuchten verschiedene Forscher durch Verimpfung des in ein Toxoid umgewandelten Toxins die Antikörperbildung hauptsächlich bei Rindern und Schafen anzuregen, um diese gegen eine Infektion mit C. pyogenes unempfindlich zu machen.

LOVELL (8) gewann Toxoid durch Zusatz von 0,25 % Formalin und anschließender 18 bis 20-stündiger Bebrütung bei 37,5° C. Die mit diesem Toxoid durch subkutane und intravenöse Injektionen immunisierten Kaninchen bildeten nur wenig Antitoxin.
Bessere Ergebnisse wurden erzielt, als die Applikation subkutan und intramuskulär vorgenommen wurde und das Formalin-Toxoid mit Alaun nach folgender Methode präzi-

pitiert wurde: Formalin wurde dem Toxin bis zu einer Endkonzentration von 0,4 % zugefügt. Das Gemisch blieb 4 Tage bei 37,5° C und wurde dann bis zu einer Endkonzentration von 0,7 % mit Alaun versetzt. Für die Dauer von 3 Tagen wurden die Flaschen mit dem Toxoid in Eiskisten aufbewahrt, der Überstand wurde täglich entfernt und durch 0,85 %ige Kochsalzlösung ersetzt. Anschließend wurde die überstehende Flüssigkeit entfernt und der Bodensatz mit Merthiolat konserviert. Mit diesem Toxoid wurden Kaninchen, Rinder und Schafe immunisiert.
Kaninchen zeigten nach intraperitonealen und intravenösen Injektionen von 3 ccm Toxoid keine Antitoxinbildung, nach intramuskulärer Injektion war die Antitoxinbildung besser.
Rinder wurden subkutan mit insgesamt 15 ccm Toxoid in Intervallen von 13 und 20 Tagen geimpft. Gegenüber den Kontrolltieren konnte kein merklicher Anstieg des Antitoxingehaltes festgestellt werden.
Schafe erhielten 2 Injektionen von insgesamt 10 ccm Toxoid subkutan im Intervall von 3 Wochen. 12-14 Tage nach der 2. Injektion wurde der Antikörperspiegel bestimmt. Gegenüber den Kontrolltieren konnte ein merklicher Anstieg der Antikörper festgestellt werden.

Das Ziel der Untersuchungen von WEITZ (16) war es, die beste Methode zur schnellen Erzeugung und nachfolgenden Aufrechterhaltung eines hohen Antitoxinspiegels bei Rindern zu finden. Für seine Untersuchungen verwendete WEITZ ein Handelspräparat "C. pyogenes-Toxoid" und ein Toxoid, das, der Methode LOVELLS folgend, durch Fällen mit Alaun hergestellt wurde. Die Versuche ergaben, daß mit dem Handelspräparat kein Antitoxin bei Rindern erzeugt werden konnte, wohl aber mit dem im eigenen Versuch hergestellten Toxoid. Dabei war die Höhe der Dosen ohne Einfluß auf die Antitoxinbildung. Eine Wiederholung der Injektionen in der Höhe der letzten Dosis war nach 86 und 160 Tagen notwendig, da zu diesem Zeitpunkt der Antitoxinspiegel seinen Normalwert wieder erreicht hatte.

In Fortführung dieser Arbeit untersuchten WEITZ und LANGRIDGE (17), in welchem Ausmaß der erzeugte Antitoxin-

spiegel eine experimentelle Infektion verhindern kann. Sie stellten fest, daß bei den als Versuchstieren benutzten Schafen ein gemessener Antitoxingehalt von 2000 "x"-Einheiten pro ml Serum ausreichte, eine Infektion mit einer Dosis von 115 000 Keimen / ml zu verhindern, andererseits genügte der Antitoxingehalt nicht, um eine Infektion mit einer Dosis von 115 000 x 10^4 Keimen / ml zu verhindern.

MATTHEWS und DERBYSHIRE (11) immunisierten Kaninchen mit Alaun-gefälltem Toxoid eines Stammes und neutralisierten mit dem Serum das Toxin von 50 Stämmen.

Experimentell versuchte LOVELL (7), eine Beziehung zwischen Höhe des Hämolysetiters und letaler Dosis aufzuzeigen. 3 Filtrate mit verschieden hohen Hämolysetitern wurden Kaninchen und Mäusen intravenös injiziert. Dabei verursachten 5 ml eines Filtrates mit einem Hämolysetiter von 1:160 bei einem Kaninchen Atembeschwerden, 3 ccm eines Filtrates mit einem Titer von 1:1280 töteten ein Kaninchen innerhalb einer ½ Stunde. 0,5 ccm eines Filtrates mit einem Hämolysetiter von 1:320 töteten 10 von 10 injizierten Mäusen, von einem Filtrat mit einem Titer von 1:1280 genügten 0,1 ccm, um alle inokulierten Mäuse zu töten. Aufgrund dieser Ergebnisse kam LOVELL zu dem Schluß, daß die hämolytische und die letale Aktivität des Filtrates identisch sind.

In einer weiteren Arbeit (9) konzentrierte LOVELL das im Filtrat enthaltene Toxin, indem er es mit Ammonsulfat fällte, über Phosphorpentoxyd trocknete und zu ⅕ des Originalvolumens wieder suspendierte. Entsprechend der Neutralisation des flüssigen und getrockneten Toxins mit Antitoxin und folgender Auswertung im Hämolyse- und Letalitätstest errechnete LOVELL, daß zum Neutralisieren des getrockneten Toxins eine ca. 11-fach größere Dosis Antitoxin gebraucht wurde, als zum Neutralisieren des flüssigen Toxins.
Aufgrund dieses Ergebnisses nahm LOVELL an, daß hämolytische und letale Wirkung des Toxins substanzmäßig Unterschiede aufweisen. Versuche, das Hämolysevermögen des Filtrates an Erythrozyten zu absorbieren, ergaben die gleichzeitige

Absorption des letalen Faktors. Nach Dialyse des Filtrates durch Cellophan waren hämolytische und letale Wirkung unabgeschwächt. Weitere Versuche der Trennung wurden von LOVELL nicht durchgeführt.

1962 hat sich PARVANTA (13) mit der Frage der aktiven Immunisierung von Mäusen mit Vakzinen von C. pyogenes beschäftigt. Von 10 untersuchten Stämmen mit einer unterschiedlich starken Pathogenität für weiße Mäuse stellte PARVANTA Toxinfiltrate durch Kultivierung der Stämme auf verschiedenen Nährböden her. Er verwendete Leber-Rindfleischwasser, Bacto-Cooked-Meat-Medium (Difco) und die Rinderherzwasser-Fleischbouillon nach LOVELL. Die vergleichenden Prüfungen im Hämolysetest ergaben, daß die Lovellsche Bouillon "für die Toxinbereitung von C. pyogenes optimal geeignet ist". PARVANTA stellte weiterhin fest, daß die von ihm benutzten Stämme sich unterschiedlich im Toxinproduktionsvermögen verhielten, und daß der Grad des Hämolysierungsvermögens eines Stammes als Ausdruck der Toxizität erfaßt werden kann. Bei einem Vergleich von 4 Pyogenes-Stämmen kam der Autor zu der Auffassung, daß das Hämolysierungsvermögen der individuellen Pathogenität eines Stammes entspricht.

Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

1. Stämme

10 Stämme von C. pyogenes wurden für die Versuche ausgewählt. Nach ihrer Fähigkeit, Gelatinase zu bilden, handelte es sich um 5 typische (gelatinasepositiv) und 5 atypische (gelatinasenegativ) Varianten. Erstere hatten die Bezeichnung 1546, 1300, 1264, 899 und T 14, letztere die Bezeichnung T 21, T 39, H 174, G 11 und C 56.

Die Stämme 1546, 1300, 1264 und 899 wurden in der Außenstelle der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin in Damaskus isoliert. Die Stämme 1546, 1300 und 1264 wurden aus Rindern isoliert, und zwar der Stamm 1546 aus einem Fetus, der Stamm 1300 aus Milchsekret und der Stamm 1264 aus einem Organ. Der Stamm 899 war ein Schafstamm.

Die Stämme T 14, T 21 und T 39 wurden Anfang 1965 aus Tonsillen klinisch gesunder Schlachtrinder gewonnen, der Stamm H 174 aus einem Ohrsekret eines an Otitis externa ulcerosa erkrankten Hundes im Frühjahr 1965 isoliert.

Die Stämme G 11 und C 56 waren Sammlungsstämme des Institutes, sie wurden seit Mai 1959 in Intervallen von etwa 4 Wochen auf Blutagarplatten überimpft. G 11 wurde aus einer Uterusschleimhautgeschabselprobe eines Rindes gewonnen. C 56 wurde aus einem abortierten Rinderfetus isoliert, verhielt sich über Jahre typisch, verlor diese Eigenschaft aber im Jahre 1964 und wurde daher der atypischen Variante zugerechnet.

Alle 10 Stämme wurden vor Beginn der Versuche auf Reinheit und auf ihr biochemisches Verhalten hin geprüft. Als Vergärungssubstrat diente Peptonwasser mit Bromthymolblau als Indikator. Jedem Röhrchen wurde ein Tropfen eines sterilen, nicht inaktivierten Rinderserums zugesetzt.

Eine Zusammenstellung des biochemischen Verhaltens der 10 geprüften Stämme zeigt Tabelle 1.

Tab. 1: Biochemisches Verhalten der 10 untersuchten C. pyogenes-Stämme

Stämme	Lackmusmilch R.	Lackmusmilch G.	Lackmusmilch P.	Nitratbouill.	Harnstoff	Ind.	Gal.	Treh.	Sal.	Lakt.	Raff.	Gluk.	Laev.	Sacch.	Malt.	Gelatine
1546	+	+	+	-	-	-	+^{v}	+	-	+	-	+^{v}	-	+	-	+
1300	+	+	+	-	-	-	+^{v}	+^{v}	-	+	-	+	-	+	+	+
1264	+	+	+	-	-	-	+^{v}	+^{v}	-	+	-	+^{v}	+	+	-	+
899	+	+	+	-	-	-	+^{v}	+^{v}	-	+^{v}	-	+^{v}	+	+	+^{v}	+
T 14	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
T 21	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+^{v}	-	+	+	-	+	-
T 39	+	-	-	-	-	-	+	+^{v}	-	+^{v}	-	+	+	-	+	-
H 174	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
G 11	+	+	-	-	-	-	+	+^{v}	-	+	-	+	+	+^{v}	+	-
C 56	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-

Die Ablesung erfolgte zum ersten Male nach 48-stündiger Bebrütung. Soweit nach weiterer Bebrütung noch Reaktionen auftraten, wurden sie als verzögert (v) gekennzeichnet. In ihrem Vergärungsgepräge entsprachen alle Stämme dem C. pyogenes. Lackmusmilch wurde von allen Stämmen gerötet. Außer T 39 brachten alle Stämme die Lackmusmilch zur Gerinnung. Eine Peptonisierung des Milchkaseins bewirkten die typischen Stämme ausnahmslos. Von den atypischen Stämmen peptonisierte nur T 21 das Milchgerinnsel.

2. Nährbodenbereitung und -beimpfung

Entsprechend den besonderen Nährbodenansprüchen, die das C. pyogenes stellt, konnten nur hochwertige Nährsubstrate für die Kultivierung verwendet werden. Da es uns auf die Toxingewinnung ankam, dienten zur Vermehrung ausschließlich flüssige Nährmedien.

Durch die Untersuchungen LOVELLS war bereits dargetan, daß Nährmedien, wie Milch, einfache Bouillon und Kalbsbrühe für die Toxingewinnung keine optimalen Nährböden waren, sich hingegen Rinderherzwasser mit Rindfleischzusatz für eine Toxinproduktion hervorragend eignete.
Deshalb stellten wir das Lovellsche Nährmedium in den Vordergrund unserer Arbeiten. Weiterhin wurde die Todd-Hewitt-Bouillon, die von MATTHEWS und DERBYSHIRE (11) für die Kultivierung von C. pyogenes empfohlen worden war, und die heute für die Züchtung für zahlreiche Keime immer wieder genannte Thioglykolat-Bouillon in die Untersuchungen einbezogen. Die beiden letzteren Nährsubstrate wurden als Fertignährböden der Firma Oxoid verwendet.

Zusammensetzung und Herstellung der Nährböden waren folgende:
1. Lovellscher Nährboden
Er wurde hergestellt, indem 1500 g frisches, fettfreies und zerkleinertes Rinderherz mit 1000 ml destilliertem Wasser 2 Stunden bei 1,2 atü autoklaviert und durch ein Papierfilter gegeben wurden. An 2 aufeinanderfolgenden Tagen wurde das Rinderherzwasser je 1 Stunde im Dampftopf sterilisiert. Dem Rinderherzwasser wurden 10 g Brunnengräber-Pepton, 3 g Kochsalz und 2,6 g di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) zugefügt. Das Substrat wurde auf pH = 7,6 eingestellt und wiederum an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 1 Stunde im Dampftopf sterilisiert. 40 ml der Rinderherzbouillon wurden nun in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und jedem Kolben wurden 12 g Schabefleisch zugefügt. Es schloß sich eine Sterilisierung im Autoklaven 1 Stunde lang bei 1,5 atü an. Die Prüfung auf Sterilität wurde vor-

genommen, indem eine Platinöse des Nährmediums auf eine Blutplatte verimpft und 24 Stunden bei 37,5° C bebrütet wurde.

2. Todd-Hewitt-Bouillon

Der Nährboden lag in Form von Tabletten der Firma Oxoid vor. Nach Angabe der Firma sind in jeder Tablette enthalten:

Aufguß von 450 g fettfreien zerkleinerten Rindfleisch	10.0 g/l
Trypton	20.0
Dextrose	2.0
Natriumbicarbonat	2.0
Natriumchlorid	2.0
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	0.4

1 Tablette wird mit 10 ml destillierten Wassers gelöst. Die Sterilisierung erfolgt im Autoklaven 10 Minuten bei 115° C. Der pH-Wert des Nährbodens liegt bei 7,8.

Die Todd-Hewitt-Bouillon wurde von mir modifiziert, indem ihr zerkleinertes Rindfleisch (Schabefleisch) zugesetzt wurde. Auf 10 ml Todd-Hewitt-Bouillon wurden 3 g Schabefleisch gegeben. Dann wurde die Brühe 1 Stunde lang bei 1,5 atü im Autoklaven sterilisiert.

3. Thioglykolat

Dieses Nährmedium lag ebenfalls als Fertignährboden vor und hat nach Angabe der Firma Oxoid folgende Zusammensetzung:

Hefe-Extrakt	5.0 g/l
Trypton	15.0
Dextrose	5.5
Thioglykolat	0.5
Natriumchlorid	2.5
l-Cystin Hydrochlorid	0.5
Resazurin	0.001
Ionagar Nr. 2	0.5

1 Tablette wird in 10 ml destillierten Wassers gelöst. Die Sterilisierung erfolgt im Autoklaven 15-18 Minuten lang bei 121° C.

Der pH-Wert des Nährbodens liegt bei 7,1.

Als Serumzusatz wurde steriles, nicht inaktiviertes Rinderserum im Verhältnis 0,1 ml auf 10 ml Thioglykolat verwendet.

Zur Erreichung einer optimalen Toxinproduktion wurde jeder Stamm durch Überimpfung auf Frischblutagar und 48-stündiger Bebrütung bei 37,5° C aktiviert.

Nährböden wie das Thioglykolat mit und ohne Serumzusatz sowie die Todd-Hewitt-Bouillon mit und ohne Frischfleischzusatz wurden mit einer Normalöse Kulturmaterial einer 48-stündigen Blutagarkultur beimpft, indem das Inoculum an der Wand des Reagenzröhrchens sorgfältig verrieben und die Menge des Inoculums möglichst gleichmäßig bemessen wurden.

Das Lovellsche Nährmedium wurde in einer Menge von 40 ml in Erlenmeyerkolben für die Toxingewinnung verwendet. Die Beimpfung wurde mit 4 ml einer Abschwemmungsflüssigkeit einer 48 Stunden bebrüteten Blutagarplatte vorgenommen, wobei als Abschwemmungsflüssigkeit Rinderherzwasserbouillon diente.

3. Toxingewinnung

Die Toxingewinnung aus den bewachsenen Kulturen wurde bei den verschiedenen Nährböden unterschiedlich gehandhabt. Grundsätzlich wurden die bewachsenen Kulturen, zu denen ausnahmslos flüssige Nährböden verwendet wurden, keimfrei filtriert. Dabei bediente ich mich der Seitz-Filter mit der EK 3-Scheibe. Bei größeren Mengen, die zu filtrieren waren, wurden Seitzfilter, die durch einen Gummistopfen 500 ccm-Saugflaschen aufgesetzt waren, verwendet. Bei kleineren Mengen wurden sterile Reagenzröhrchen in die Saugflaschen gegeben und so angebracht, daß sie die geringe Menge des Filtrates aufnehmen konnten. Die Saugflaschen mit dem aufgesetzten Seitzfilter wurden, in Zeitungspapier gewickelt, vor Gebrauch an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je ½ Stunde im Dampftopf sterilisiert und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Zum Entfernen der bei dem Lovellschen Nährboden zugesetzten zerkleinerten Fleischbestandteile wurde die 72 Stunden bewachsene Lovellsche Bouillon stets erst durch eine doppelte Lage von Mullgaze gegeben und 10 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert, ehe sich die keimfreie Filtration mit dem Seitzfilter anschloß. Die Filtration erfolgte unter Benutzung von Saugdruck, der durch eine Saugpumpe bewirkt wurde.

Die Filtration bei den Kulturen, die mit dem Todd-Hewitt-Nährsubstrat gewonnen wurden, erfolgte stets nach 48-stündiger Bebrütung bei 37,5° C. Von den 10 Pyogenes-Stämmen wurden je Stamm 2 Röhrchen mit 10 ml Nährsubstrat beimpft. Von einem Röhrchen wurde das Toxin mittels Filtration, von dem anderen mittels Zentrifugation 30 Minuten bei 15000 U/min. gewonnen.

In gleicher Weise wurde mit den Kulturen, die mit der Thioglykolat-Bouillon gewonnen wurden, verfahren.

4. Toxinauswertung

Das Toxin wurde im Hämolyse- und Letalitätstest ausgewertet. Im Hämolysetest wurden in 14 Agglutinationsröhrchen je 0,25 ml physiologische Kochsalzlösung vorgelegt. In das erste Agglutinationsröhrchen wurde 0,25 ml Toxinfiltrat gegeben und nach gutem Durchmischen 0,25 ml Flüssigkeit in das zweite Agglutinationsröhrchen pipettiert. Wieder wurde gut durchmischt und weiterpipettiert, so daß eine geometrische Reihe 1:2, 1:4, 1:8 ... bis 1:16384 entstand. Das 15. Agglutinationsröhrchen diente als Kontrolle und enthielt 0,25 ml physiologische Kochsalzlösung.

Anschließend wurde in jedes Röhrchen 0,25 ml einer 1 %igen Kaninchen-Erythrozyten-Suspension gegeben. Alle Röhrchen wurden dann im Wasserbad 1 Stunde lang bei 37,5° C inkubiert. Die Ablesung erfolgte unmittelbar nach der Herausnahme der Röhrchen aus dem Wasserbad.

Eine 100 %ige Hämolyse war durch einen klaren rotgefärbten Überstand mit vollständiger Lösung der Erythrozyten gekennzeichnet und wurde mit 4 Kreuzen (++++) beurteilt. War keine Hämolyse eingetreten, so war der Überstand hell und klar, während die Erythrozyten als scharf abgegrenzter Bodensatz die Kuppe des Röhrchens bedeckten. Von dem Kontrollröhrchen war in jedem Falle ein negatives Ergebnis zu verlangen. Als Endpunkt wurde das Röhrchen angesehen, in dem die Hälfte der Erythrozyten gelöst war und der Überstand eine deutliche rote Farbe erkennen ließ. Die 50 %ige Hämolyse wurde mit 2 Kreuzen (++) bewertet.

Im Letalitätstest wurde das Filtrat weiblichen oder männlichen Mäusen im Gewicht von 18-21 g intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Höchstmenge betrug 0,5 ml. Als Versuchsmäuse wurden Albinomäuse des Zuchtstammes NMRI aus eigener Zucht verwendet.

Die Injektion ließ sich mit einer Tuberkulinspritze unschwer durchführen.

Zu jedem Versuch wurden 4 oder 5 Mäuse mit fallenden Mengen (0,5 ml, 0,4 ml, 0,3 ml usw.) des auf Toxizität zu prü-

fenden Filtrates inokuliert. Als kleinste letal wirkende Dosis (Dlm) wurde die Menge angesehen, die alle Mäuse innerhalb von 48 Stunden tötete.

Das Ergebnis der Toxinauswertung mit dem Hämolysetest und Letalitätstest bei den 10 für die Arbeit verwendeten Stämmen von C. pyogenes bei Verwendung des Lovell-Substrates (pH = 6,6) und einer Bebrütungszeit von 72 Stunden ist in folgender Übersicht zusammengestellt:

Stämme:	1546	1300	1264	899	T14	T21	T39	H174	G11	C56
Häm.T.	16	16	16	64	16	-	-	1024	2048	1024
Let.-T.	-	-	-	-	-	-	-	0,12	0,09	0,12

Im Hämolysetest sind die reziproken Titer angegeben, im Letalitätstest wird die Dlm in ml ausgedrückt.

Die Stämme H 174, G 11 und C 56 erwiesen sich als starke Toxinbildner, die Stämme 1546, 1300, 1264 und T 14 bildeten sehr wenig Toxin, der Stamm 899 war in der Toxinbildung etwas aktiver. Die Stämme T 21 und T 39 bildeten kein im Hämolysetest nachweisbares Toxin.
In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Hämolysetestes stand das Ergebnis des Letalitätstestes insofern, als nur das Toxin der 3 stärksten Toxinbildner H 174, G 11 und C 56 Mäuse tötete und zwar in Mengen des Filtrates von 0,12 ml (H 174, C 56) und 0,09 ml (G 11).

B. Ergebnisse der Toxinbestimmung nach Kultivierung in

1. Lovellscher Bouillon

Bei der Toxingewinnung anderer Bakterienarten hat man immer wieder versucht, die Toxinproduktion der einzelnen Stämme durch Änderung der Nährbodenzusammensetzung nach der günstigen Seite hin zu beeinflussen. Es sei hier auf eine sehr umfangreiche Arbeit von WILDFÜHR (19) verwiesen, in der alle Möglichkeiten, die Toxinproduktion von Clostridien durch Änderung der Nährböden zu bewirken, geprüft wurden und der Autor zu dem Ergebnis kam, daß die Toxinproduktion bei gleicher Züchtungstechnik bei den einzelnen Stämmen verschieden war. In einer weiteren Arbeit kam WILDFÜHR (18) zu dem Schluß, daß die Toxinproduktion der in ihrem Toxinbildungsvermögen abgeschwächten Clostridienstämme durch Kultur- und Tierpassagen gesteigert werden konnte, daß es aber unmöglich war, Stämme mit ursprünglich ungenügendem Toxinbildungsvermögen in dieser Eigenschaft durch Passagen über verschiedenartig hergestellte Nährmedien zu ändern.

Abgesehen von den Lovellschen Arbeiten, liegen Versuchsergebnisse anderer Autoren nicht vor, die sich mit der Frage der Steigerung der Toxinproduktion bei C. pyogenes durch verschiedene Nährbodenarten beschäftigt haben. Bei Clostridium welchii konnte HINZ (5) unter anderem durch Zugabe von pankreatisch verdautem Casein-Hydrolysat die Toxinbildung steigern. Diese von HINZ im Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin durchgeführten Untersuchungen ermutigten mich, verschiedene Peptonarten in der Lovellschen Bouillon zu verwenden.

Zunächst wurde anstelle des Brunnengräber-Peptons das Proteose-Pepton der Fa. Oxoid versucht, das durch Einwirkung von Papain aus Frischfleisch gewonnen wird. Es soll sich vorzüglich für die Verwendung von Nährböden eignen, in denen die Bildung von Toxinen beurteilt werden soll. Nach "THE OXOID MANUAL" (20) soll sich dieses Pepton in Nährböden bewährt haben, die für die Züchtung von Corynebacterium diphtheriae zur Untersuchung der Toxinbildung dienen.

Das Bacto-Pepton der Fa. Difco wurde von MARBÉ und OLARIU (10) ebenfalls für Nährböden empfohlen, in denen die Toxinbildung von Corynebacterium diphtheriae beurteilt wird.

Um zu gewährleisten, daß etwa gleiche Bedingungen für die Kultivierung gegeben waren, wurde in die Versuchsreihe auch noch einmal der Lovellsche Nährboden mit dem Brunnengräber-Pepton einbezogen.

Die Versuchsreihen wurden allerdings an verschiedenen Tagen durchgeführt, wobei Schabefleisch, das an verschiedenen Tagen gewonnen worden war und von verschiedenen Tieren stammte, verwendet wurde. Wiederholt vorgenommene Messungen des pH-Wertes bei dem Lovellschen Substrat vor der Kultivierung hatten gezeigt, daß das Schabefleisch den pH-Wert unterschiedlich senken kann.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den verschiedenen Stämmen und Nährbodenarten sind in Tabelle 2 übersichtlich zusammengestellt.

Tab. 2

Vergleichende Betrachtung des Toxinbildungsvermögens aller Stämme in der Lovellschen Bouillon mit Zusatz verschiedener Peptonarten

Stamm	Brunnengr.-P. pH=6,4		Proteose-P. pH=6,7		Bacto-P. pH=6,8		pankr.verd. Casein-Hydr. pH=6,8	
	H-Titer	Dlm	H-Titer	Dlm	H-Titer	Dlm	H-Titer	Dlm
1546	-	-	-	-	-	-	-	-
1300	4	-	-	-	-	-	-	-
1264	-	-	-	-	-	-	-	-
899	1024	0,1	-	-	4	-	-	-
T 14	256	0,4	-	-	8	-	-	-
T 21	-	-	-	-	32	-	16	-
T 39	4	-	-	-	32	-	16	-
H 174	1024	0,11	-	-	1024	0,1	256	0,5
G 11	2048	0,06	-	-	1024	0,1	64	-
C 56	1024	0,1	1024	0,09	1024	0,1	64	-

Die Hämolysetiter sind in Tabelle 2 als reziproke Werte, die Dosis letalis minima (Dlm) in ml aufgeführt.

Offenbar hat die Art des Peptons einen Einfluß auf die Menge des gebildeten Toxins. Bei dem mit Brunnengräber-

Pepton hergestellten Lovell-Substrat zeigen die Stämme 899, T 14, H 174, G 11 und C 56 wieder ein gutes Toxinbildungsvermögen. Die Stämme 1300 und T 39 bleiben schlechte Toxinbildner, während bei den Stämmen 1546, 1264 und T 21 kein Toxin nachweisbar ist.

In der mit Proteose-Pepton versetzten Lovellschen Bouillon bildeten alle untersuchten Stämme, bis auf C 56, kein Toxin. Stamm C 56 zeigt sich wiederum als guter Toxinbildner.

In der Lovellschen Bouillon mit Bacto-Pepton-Zusatz sind die Stämme H 174, G 11 und C 56 starke Toxinbildner, die Toxinmenge der Stämme 899, T 14, T 21 und T 39 ist nur gering. Bei den Stämmen 1546, 1300 und 1264 läßt sich ein Toxin nicht nachweisen.

In der Lovellschen Bouillon mit pankreatisch verdautem Casein-Hydrolysat bildet der Stamm H 174 mäßige Mengen Toxin, die gerade noch ausreichen, um bei Mäusen eine letale Wirkung zu erzielen. Die Stämme T 21, T 39, G 11 und C 56 bilden nur geringe Toxinmengen, während bei den Stämmen 1546, 1300, 1264, 899 und T 14 Toxin nicht nachweisbar ist.

Mit dem Proteose-Pepton wurde der Versuch unter Änderung des pH-Wertes (7,2 statt 6,7) mit den Stämmen nochmals wiederholt. Dabei bildeten nur die Stämme H 174 und G 11 geringe Mengen Toxin (Hämolysintiter 1:8); bei allen anderen Stämmen war Toxin nicht nachzuweisen. Aus dem Ergebnis ist zu entnehmen, daß das Proteose-Pepton keinen günstigen Einfluß auf die Toxinbildung hatte.

2. Ergebnisse der Toxinbestimmung nach Kultivierung in Todd-Hewitt-Bouillon

Das Nährmedium ist in der Zusammensetzung dem Lovellschen Substrat ähnlich, bietet aber in der Herstellung als Fertignährboden mehr Vorteile.

Nach den Beobachtungen von MATTHEWS und DERBYSHIRE (11) bildet C. pyogenes in der Todd-Hewitt-Bouillon ein Hämolysin, welches Membranfilter passiert, aber keine Seitz-EKS-Filter. Weiterhin stellten die Autoren fest, daß die Hämolysintiter der von ihnen untersuchten Stämme nach 48-stündiger Kultivierung am höchsten waren.

Diese Beobachtungen legte ich meinen Untersuchungen zugrunde und bestimmte bei den 10 Stämmen in der Todd-Hewitt-Bouillon im Filtrat und Überstand nach 48-stündiger Bebrütung mit dem Hämolysetest die Mengen des gebildeten Toxins.

Vor Auswertung des Überstandes im Hämolysetest wurde der Inhalt der Kulturröhrchen 30 Minuten lang hochtourig (15000 U/min.) zentrifugiert. Nach Abheben der Flüssigkeit wurde durch Überimpfen einer Normalöse auf Frischblutagar auf C. pyogenes untersucht. Dabei ergab sich, daß bei allen Stämmen im Überstand noch große Mengen von Keimen vorhanden waren, also eine keimfreie Gewinnung des Überstandes mit der angewandten Art der Zentrifugation nicht gelungen war. Das Ergebnis des Hämolysetestes bei Filtrat und Überstand war folgendes:

Stamm:	1546	1300	1264	899	T14	T21	T39	H174	G11	C56
Filtr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Überst.	-	-	-	-	-	-	-	-	32	64

Nur die Stämme G 11 und C 56 bildeten im Überstand der Todd-Hewitt-Bouillon geringe Mengen Toxin (G 11 = 1:32; C 56 = 1:64), im Filtrat war bei allen Stämmen ein Hämotoxin nicht nachweisbar.

In einem weiteren Versuch wurden der Todd-Hewitt-Bouillon, ähnlich wie in der Lovellschen Rezeptur, 3 g Schabefleisch auf 10 ml Todd-Hewitt-Bouillon zugefügt. Dabei sank der pH-Wert des Nährmediums auf 6,5. Nach 48-stündiger Bebrütung wurden Filtrat und Überstand gewonnen und im Hämolysetest ausgewertet. Die Hämolysetiter von Filtrat und Überstand der in der Todd-Hewitt-Bouillon mit Schabefleischzusatz kultivierten Stämme sind in folgender Übersicht zusammengestellt:

Stamm:	1546	1300	1264	899	T14	T21	T39	H174	G11	C56
Filtr.	-	8	8	64	4	-	-	512	256	256
Überst.	256	512	256	1024	128	-	-	1024	2048	1024

Bei allen guten Toxinbildnern waren die Toxinmengen im Überstand größer als im Filtrat. Bei den schwachen Toxinbildnern war zwischen Toxinmenge im Überstand und Filtrat eine erhebliche Differenz feststellbar.

Stamm 1546 wies im Filtrat kein Toxin auf, während im Überstand Toxin nachweisbar war. Im Filtrat der Stämme 1300, 1264, 899 und T 14 waren nur geringe Mengen Toxin vorhanden, im entsprechenden Überstand jedoch große Toxinmengen. Bei den Stämmen T 21 und T 39 wurde weder im Filtrat noch im Überstand Toxin festgestellt. Die Stämme H 174, G 11 und C 56 zeigten ein besonders gutes Toxinbildungsvermögen, wobei im Überstand höhere Hämolysetiter als im Filtrat erreicht wurden.

3. Ergebnisse der Toxingewinnung nach Kultivierung in Thioglykolat-Bouillon

Es sollte versucht werden, das Toxin von C. pyogenes aus einem Nährmedium zu gewinnen, das eine gute und schnelle Keimvermehrung der Bakterien gewährleistet. Innerhalb von 24 Stunden zeigte C. pyogenes in Thioglykolat ein dichtes schleierartiges Wachstum. Die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien ließ sich über 11 Tage verfolgen.

Reagenzröhrchen mit 10 ml Thioglykolat wurden mit 48-stündigem Kulturmaterial sämtlicher Stämme inokuliert und bei 37,5° C bebrütet. Jeweils nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde der Inhalt eines Röhrchens 10 Minuten bei 3000 U/min. zentrifugiert und das Zentrifugat anschließend durch Seitzfilter gegeben. Die nach 24, 48, 72 und 96 Stunden gewonnenen Filtrate aller Stämme wiesen im Hämolysetest kein Toxin auf.

Nach den Untersuchungen WILDFÜHRS (19) an Clostridien wird die Toxinbildung günstig beeinflußt, wenn dem Nährboden Serum zugesetzt wird. Da C. pyogenes als serophiler Keim bekannt ist, wurde dem Thioglykolatmedium in einer Menge von 1 % nicht inaktiviertes Rinderserum beigefügt.

Nach Beimpfung des Nährmediums mit 48-stündigem Kulturmaterial sämtlicher Stämme und Bebrütung bei 37,5° C wurde jeweils nach 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden der Inhalt eines Kulturröhrchens filtriert und das Substrat eines zweiten Röhrchens durch Zentrifugation als Überstand gewonnen. Die Auswertung im Hämolysetest ergab, daß weder im Filtrat noch im Überstand der Stämme ein Toxin nachweisbar war.

4. Toxingewinnung nach Veränderung des pH-Wertes in der Lovellschen Bouillon

Die Tatsache, daß die Zugabe von Schabefleisch zur Herzwasserbouillon (pH = 7,6) den pH-Wert des Nährbodens vor der Kultivierung erniedrigte, und die vor jedem Versuch gemessenen pH-Werte nicht konstant waren, gab zu der Fragestellung Anlaß, ob der pH-Wert des Nährbodens die Toxinbildung von C. pyogenes beeinflussen kann. TOPLEY und WILSON (15) geben für ein optimales Wachstum von C. pyogenes auf festen Nährböden einen pH = 7,5 an, ohne den für eine optimale Toxinproduktion erforderlichen pH-Bereich zu nennen. Da die Toxinproduktion möglicherweise von dem pH-Wert des Nährmediums abhängig ist, war zu prüfen, welcher pH-Bereich im Nährmedium für die Toxinbildung am günstigsten war.

Als Nährboden wurde die Lovellsche Bouillon mit Zusatz von Brunnengräber-Pepton gewählt, da es sich gezeigt hatte, daß mit diesem Nährmedium eine durchweg optimale Toxinproduktion zu erreichen war. Für die Kultivierung wurden als 3 gute Toxinbildner die Stämme H 174, G 11 und C 56 und als schlechte Toxinbildner die Stämme 1300 und T 21 ausgewählt.

Beginnend mit pH 5,4 wurden Erlenmeyerkolben von Lovellscher Bouillon mit pH 6,1, 6,4, 6,6, 6,9, 7,2, 7,5 und 7,9 hergestellt. Die pH-Messung erfolgte mit dem "Acidometer" der Askania-Werke Berlin mit einer Glaselektrode Typ 405 der Firma Ingold/Frankfurt, wobei die Werte mit 10 %iger Natronlauge oder Salzsäure eingestellt wurden.

In einem Kontrollversuch war zu prüfen, ob die pH-Werte von 5,4 bis 7,9 bei Erythrozyten eine Hämolyse verursachen. Unbeimpfte Lovellsche Bouillon wurde auf die gleichen Werte wie die zu beimpfende Bouillon eingestellt, 72 Stunden bebrütet, filtriert und im Hämolysetest ausgewertet. Bei pH-Werten von 5,4 bis 7,9 kam es in keinem Fall zu einer Hämolyse.

Die Ergebnisse des Hämolysetestes an Kulturfiltraten 72 Stunden bebrüteter Lovellscher Bouillonkulturen der 5 untersuchten Stämme (1300, T 21, H 174, G 11 und C 56) sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Abhängigkeit des Hämolysetiters der untersuchten Stämme vom pH-Wert des Nährbodens

pH d.Nährb. vor Bebrüt.	untersuchte C. pyogenes-Stämme				
	1300	T 21	H 174	G 11	C 56
7,9	-	-	1:2048	1:1024	1:2048
7,5	-	-	1:2048	1:1024	1:4096
7,2	-	1:8	1:256	1:4096	1:1024
6,9	-	-	1:2048	1:2048	1:2048
6,6	1:16	-	1:1024	1:2048	1:1024
6,4	1:4	-	1:1024	1:2048	1:1024
6,1	1:32	-	1:1024	1:1024	1:1024
5,4	1:4	1:4	1:64	1:128	1:128

Filtrate aus der Lovellschen Bouillon mit dem pH-Bereich 6,1 - 7,9 zeigten nach der Bebrütung einen niedrigeren pH-Wert als vor der Bebrütung. Lediglich das Filtrat, das aus der Lovellschen Bouillon mit dem pH-Wert 5,4 gewonnen worden war, wies nach Bebrütung einen höheren pH-Wert als vor der Bebrütung auf.

Die Stämme 1300 und T 21, die sich in den vorher beschriebenen Versuchen schon als schlechte Toxinbildner gezeigt hatten, bildeten auch in der Lovellschen Bouillon mit den verschieden eingestellten pH-Werten keine oder nur geringe Mengen Toxin. Von Stamm 1300 konnten nur im pH-Bereich von 5,4 - 6,6 geringe Mengen eines Toxins gewonnen werden, bei dem pH-Bereich 6,9 - 7,9 war kein Toxin nachweisbar. Stamm T 21 bildete nur bei den pH-Werten 5,4 und 7,2 wenig Toxin.

Die als gute Toxinbildner bekannten Stämme H 174, G 11 und C 56 produzierten im pH-Bereich 6,1 bis 7,9 reichliche Mengen Toxin. Bei allen drei Stämmen fiel jedoch der Hämolysetiter bei pH 5,4 signifikant ab, so daß ich annehmen möchte, daß dieser niedrige pH-Wert einen nachteiligen Einfluß auf die Toxinbildung ausübte.

C. Vergleich der Wachstumskurve und des Toxinbildungsvermögens eines guten und schlechten Toxinbildners

Die Frage, ob das Toxinbildungsvermögen von der Vermehrungsrate der Keime im Nährmedium abhängig ist, wurde an einem guten (C 56) und einem schlechten (1300) Toxinbildner geprüft

Zur Versuchsanordnung sei bemerkt, daß mit jedem Stamm 5 Erlenmeyerkölbchen, die je 40 ml Lovellsches Herzwasserrindfleischsubstrat enthielten, beimpft wurden. Als Inokulum dienten 4 ml einer Abschwemmungsflüssigkeit einer Blutplatte, die nach Beimpfung 48 Stunden bebrütet worden war, wobei als Abschwemmungsflüssigkeit Herzwasserbouillon verwendet wurde. Von 4 Kölbchen wurden nach 24-, 48-, 72- und 96-stündiger Bebrütung Filtrate hergestellt und im Hämolysetest ausgewertet. In dem 5. Kölbchen wurden die Keimzahlen mittels des indirekten Kulturverfahrens (Blutplatte) unmittelbar nach der Beimpfung und 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Beimpfung bestimmt.

Zur Keimzählung wurde eine Verdünnungsreihe in der Weise angesetzt, daß in 3 Reagenzröhrchen je 9,9 ml und in weitere 3 Röhrchen je 9,0 ml sterile physiologische Kochsalzlösung vorgelegt wurde. In das 1. Röhrchen wurden dann 0,1 ml der beimpften und bebrüteten Lovellschen Bouillon pipettiert, nach gutem Durchmischen wurden 0,1 ml in das 2. Röhrchen gegeben und wiederum 0,1 ml in das 3. Röhrchen. In das 4. Röhrchen kamen 1,0 ml, ebenso in das 5. und 6. Röhrchen, so daß eine Verdünnungsreihe 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} und 10^{-9} entstand. Von den Verdünnungen 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} und 10^{-9} wurden je 0,1 ml auf die Oberfläche einer Frischblutplatte gegeben und gleichmäßig verteilt. Dann wurden die Platten 48 Stunden bei 37,5° C bebrütet und alle aufgegangenen Kolonien, die etwa stecknadelspitzengroß waren und einen schwachen hämolytischen Hof zeigten, ausgezählt.

Ich bin mir bewußt, daß diese Technik der Keimzählung von der üblichen Technik der Keimzählung abweicht, hatte aber darauf verzichten müssen, die Beimpfung des Blutagars in flüssiger abgekühlter Form vorzunehmen, weil die Kolonien

am besten auf der Oberfläche des Blutagars zu erkennen waren. Jeder Versuch mit 5 Kölbchen je Stamm wurde nacheinander zweimal wiederholt, so daß insgesamt 3 Werte für die Keimzählung (1. V., 2. V., 3. V. s. Tab. 4) und die Filtrattoxinbestimmung (1. V., 2. V., 3. V. s. Tab. 5) erlangt wurden.

Als Basis für die Bestimmung der Wachstumskurve wurde die Verdünnung 10^{-7} gewählt. Waren die Kolonien nicht mehr auszählbar (Höchstgrenze 500 Kolonien auf der Platte), so wurde die Keimzahl der Verdünnung 10^{-8} herangezogen.

Die Ergebnisse des Keimzählungsverfahrens nach der Plattenmethode sind in Tabelle 4 dargestellt. Die linke Spalte der Tabelle 4 zeigt die in den 3 Versuchen ausgezählten Keime der Stämme C 56 und 1300. Aus der rechten Spalte sind die Mittelwerte der ausgezählten Keime (Gesamtkeimzahl dividiert durch Anzahl der Versuche) zu ersehen. War die Keimzahl nicht bestimmbar (= ∞), so wurde der Mittelwert nur auf die ablesbaren Werte bezogen.

Tab. 4: Zahl der nachgewiesenen Keime in der Verdünnungsstufe 10^{-7} aus 0,1 ml Lovellscher Bouillon mit wachsender Bebrütungsdauer der Pyogenes-Stämme C 56 und 1300

	C 56			1300			C 56	1300
	1.V.	2.V.	3.V.	1.V.	2.V.	3.V.	Mittelwert	Mittelwert
n. Beimpfg.	0	1	275	121	7	15	92	47
4 Std.	150	14	160	209	3	84	108	99
8 "	360	10	167	210	12	116	179	113
12 "	232	-	380	361	74	135	306	190
16 "	503	0	429	367	69	212	311	216
20 "	30	88	663	218	164	770	260	384
24 "	920	250	617	1780	250	710	596	913
48 "	83	40	2660	1110	120	1270	927	833
72 "	∞	100	1520	∞	∞	200	810	200
96 "	1500	154	970	2350	2560	130	541	1013

In Tabelle 4 bedeuten = Anzahl der Keime auf der Platte nicht mehr auszählbar:
- = Verunreinigung der Platte

In Tabelle 5 sind die Hämolysetiter der nach 24-, 48-, 72- und 96-stündiger Bebrütung gewonnenen Filtrate der Stämme C 56 und 1300 dargestellt. In der linken Spalte sind die reziproken Werte der in den 3 Versuchen titrierten Hämolysetiter der beiden Stämme C 56 und 1300 eingetragen, aus der rechten Spalte sind die Mittelwerte (Gesamttiter dividiert durch Anzahl der Versuche) zu entnehmen.

Tab. 5: Hämolysetiter der nach 24-, 48-, 72- und 96-stündiger Bebrütung gewonnenen Filtrate der Stämme C 56 und 1300

Stunden	C 56			1300			C 56	1300
	1.V.	2.V.	3.V.	1.V.	2.V.	3.V.	Mittelwert	Mittelwert
24 Std.	2048	512	16	8	64	128	859	67
48 "	4096	2048	4096	8	-	64	3413	24
72 "	2048	1024	4096	8	4	-	2389	4
96 "	4096	2048	2048	-	-	-	2731	-

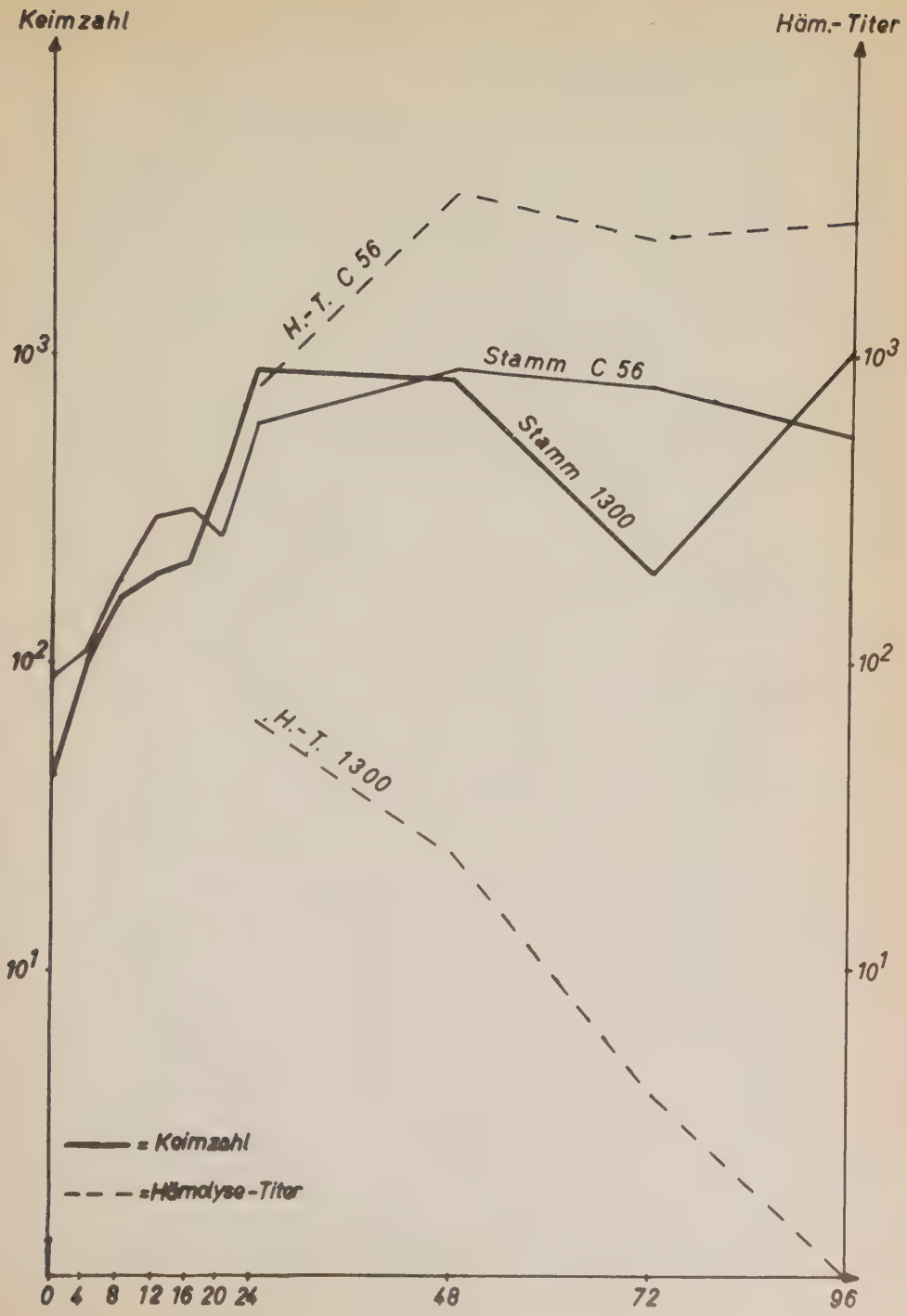
Die Beziehung zwischen Hämolysetiter und Keimwachstum ist graphisch dargestellt, zur besseren Übersichtlichkeit wurde der logarithmische Maßstab gewählt.

Aus der graphischen Darstellung ist zu entnehmen, daß die höchste Keimzahl zwischen der 24. und 48. Stunde erreicht wird, wobei die Hauptvermehrungsphase nach 24 Stunden abgeschlossen zu sein scheint. Zwischen der 48. und 96. Stunde bleibt die Keimzahl etwa gleich. Der Wert des Stammes 1300 in der 72. Stunde liegt zwar deutlich tiefer als der 48- und 96-Stundenwert, ich möchte darin aber keinen charakteristischen Abfall sehen, da diesem Wert, wie aus

Tabelle 4 ersichtlich, nur eine Messung zugrunde liegt und ein ähnlicher Tiefpunkt bei Stamm C 56 fehlt. Beide Keimarten verhalten sich also in der Vermehrung und in der erreichten maximalen Keimzahl etwa gleich.

Demgegenüber weisen die Hämolysetiter der beiden Stämme C 56 und 1300 in der Verlaufsform und in der Titerhöhe Unterschiede auf. Der Hämolysetiter des Stammes C 56 erreicht sein Maximum nach 48 Stunden und fällt dann bis zur 96. Stunde leicht ab. Der Hämolysetiter des Stammes 1300 zeigt schon bei der 1. Titrierung nach 24-stündiger Bebrütung den Höchstwert und fällt dann kontinuierlich ab. In der 96. Stunde ist in allen 3 Versuchen ein Toxin nicht mehr nachzuweisen.

Der Hauptunterschied bei den beiden geprüften Stämmen liegt in der Erreichung der maximalen Titerhöhe. Während Stamm 1300 einen maximalen Durchschnittstiter 1:67 aufweist, erreicht Stamm C 56 einen maximalen Durchschnittstiter von 1:3413.
Da die Keimzahlen gleich waren, ist es naheliegend, die Unterschiede als Stammeseigenheiten aufzufassen.


Keimzahl
Häm.-Titer
H.-T. C 56
Stamm C 56
Stamm 1300
H.-T. 1300
10^3
10^2
10^1
= Keimzahl
= Hämolyse-Titer
0 4 8 12 16 20 24
48
72
96

Besprechung der Ergebnisse

Nach Untersuchungen von LOVELL hat das Toxin des C. pyogenes die Eigenschaft, rote Blutkörperchen zu hämolysieren und bei intravenöser Injektion auf Mäuse und Kaninchen toxisch zu wirken. LOVELL bemühte sich, beide Eigenschaften des Toxins zu trennen, was ihm aber nicht gelang. Soweit den Arbeiten LOVELLS entnommen werden kann, hat der Autor seine Toxinuntersuchungen nur mit einer begrenzten Anzahl von Stämmen durchgeführt. Lediglich an einer Stelle einer Arbeit (7) erwähnt der Autor, daß von 45 Stämmen 43 Stämme ein Hämolysin von verschiedener Stärke bildeten. Damit deutete LOVELL an, daß seine Stämme ein unterschiedliches Toxinbildungsvermögen aufwiesen und 2 Stämme offenbar nicht befähigt waren, nachweisbare Toxinmengen zu produzieren.

Das Ziel eigener Untersuchungen war, die Beeinflußbarkeit der Toxinproduktion bei 10 Pyogenes-Stämmen verschiedener Herkunft festzustellen. Dabei war zunächst notwendig zu prüfen, ob die Zusammensetzung des Nährmediums, insbesondere in Hinsicht auf die verwendeten Peptone eine Bedeutung für die Toxinbildung hatte.

Von den in die Versuche einbezogenen Peptonen erwies sich das Brunnengräber-Pepton am günstigsten, wenn als Grundsubstrat nach dem Lovellschen Vorschlag Ochsenherzwasser mit Rindfleischzusatz verwendet wurde. Die untersuchten 10 Stämme verhielten sich aber in ihrer Toxinbildung in der mit Brunnengräber-Pepton hergestellten Lovellschen Bouillon durchaus unterschiedlich, indem 3 als gute Toxinbildner bekannte Stämme (H 174, G 11 und C 56) hohe Mengen an Toxin produzierten, 2 Stämme (899, T 14) mäßige Mengen, 3 Stämme (1300, T 21 und T 39) geringe Mengen und 2 Stämme (1546, 1264) kein Toxin bildeten. Das Bacto-Pepton erzielte bei den guten Toxinbildnern nahezu gleiche Toxinmengen, jedoch blieben die mäßigen und geringen Toxinbildner unter den Werten, die sie bei dem Brunnengräber-Pepton erreicht hatten. Bei Verwendung von Casein-Hydrolysat anstelle von Pepton kam es bei den guten Toxinbildnern zu einer deutlichen Reduktion der Toxinmengen, während ein Proteose-

Pepton die Toxinbildung bei allen Stämmen mit einer Ausnahme (C 56) unterdrückte.

Der Versuch, anstelle des Lovellschen Nährsubstrates die Todd-Hewitt-Bouillon zu setzen, hatte für die Toxinproduktion nur Erfolg, als der Todd-Hewitt-Bouillon zerkleinertes Rindfleisch im gleichen Verhältnis wie im Lovell-Substrat zugefügt wurde. In dieser Bouillon bildeten die drei guten Toxinbildner zwar erhebliche Toxinmengen, diese blieben aber unter den Werten, die im Lovellschen Substrat erzielt wurden. Die mäßigen und schlechten Toxinbildner blieben in ihrer Aktivität, Toxin zu produzieren, gering.

Ein weiterer Versuch, die Toxinbildung durch Vermehrung der Keime in der Thioglykolatbouillon zu steigern, scheiterte bei allen Stämmen, da nach 24- bis 144-stündiger Bebrütung keine im Hämolysetest feststellbaren Toxine nachgewiesen werden konnten.

Aus den Untersuchungsergebnissen ist zu entnehmen, daß die von LOVELL empfohlene Rinderherzwasserbouillon mit Rindfleischzusatz der optimalste Nährboden für die Gewinnung von Toxinen des C. pyogenes ist.

Dieses Ergebnis konnte auch durch die Untersuchungen PARVANTAS bestätigt werden, der die Toxinbildung von C. pyogenes in verschiedenen flüssigen Nährmedien untersuchte und die Lovellsche Bouillon als optimal für die Toxingewinnung ansah.

Die Produktion von Hämotoxin und im Mäuseletalitätstest nachweisbarem Toxin zeigte eine gewisse Parallelität, denn nur mit den Kulturfiltraten der guten Toxinbildner ließ sich eine letale Wirkung bei Mäusen erzielen. Ebenso war aufgrund von Ergebnissen anderer Untersuchungen, die in die vorliegende Arbeit nicht einbezogen wurden, auch eine dermonekrotische Wirkung des Toxins dieser Stämme auf die Haut des Meerschweinchens nachzuweisen, so daß die Untersuchungen LOVELLS über die hämolytische, letale und dermonekrotische Wirkung des Toxins von C. pyogenes bestätigt werden konnten.

Wie sich bei pH-Messungen des Lovellschen Nährmediums ergab, kam es durch den Rindfleischzusatz zur Herzwasserbouillon zu einem unterschiedlichen Absinken des pH-Wertes je nach

Beschaffenheit des verwendeten Rindfleisches. Diese Tatsache gab Anlaß zu prüfen, ob der pH-Wert eine entscheidende Rolle für die Toxinproduktion spielt. Untersuchungen mit dem Lovell-Substrat bei verschiedenen pH-Werten ließen erkennen, daß gute Toxinbildner im pH-Bereich 6,1 bis 7,9 ohne Ausnahme große Mengen von Toxin bilden, schlechte Toxinbildner hingegen schlechte Toxinbildner bleiben. Nur bei dem pH-Wert 5,4 sanken die Toxinwerte bei guten Toxinbildnern deutlich ab. Schlechte Toxinbildner produzierten bei diesem pH-Wert ebenfalls nur noch geringe Mengen von Toxin.

Bei dem Versuch, die Nährsubstrate zu ändern, trat immer wieder hervor, daß Stämme, die gute Toxinbildner waren, in einem optimalen Nährboden reichliche Mengen Toxin bildeten, hingegen mäßige oder schlechte Toxinbildner in ihrem Toxinbildungsvermögen mäßig oder schlecht blieben. Diese Tatsache scheint dafür zu sprechen, daß das Toxinbildungsvermögen eine individuelle Eigenschaft der einzelnen Stämme ist. Auch PARVANTA hatte darauf hingewiesen, daß die Toxinproduktion eine Stammeseigenheit zu sein scheint.

Um zu unterscheiden, ob die Fähigkeit, große oder geringe Toxinmengen zu bilden, mit der Vermehrungsintensität der einzelnen Stämme in einem ursächlichen Zusammenhang steht, wurden an einem guten und an einem schlechten Toxinbildner die Vermehrungs- und Toxinproduktionsaktivität miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß beide Stämme nach 24-stündiger Bebrütung die Maximalzahlen an Keimen erreichten, aber unterschiedliche Toxinmengen bildeten. Der gute Toxinbildner C 56 wies nach 24 Stunden einen Hämolysetiter von 1:859 auf, während der schlechte Toxinbildner in gleicher Zeit einen Titer von 1:64 erreichte. Die Keimzahlen unterschieden sich zu dieser Zeit nur gering. Der gute Toxinbildner erreichte maximale Toxinmengen nach 48-stündiger Bebrütung, während der schlechte Toxinbildner zu keiner Steigerung der Toxinproduktion mehr befähigt war. Nach 72- und 96-stündiger Bebrütung kam es bei dem guten Toxinbildner zu einer geringen Reduktion des Toxingehaltes, bei dem schlechten Toxinbildner hingegen zu einem Absinken auf den Nullwert.

Der Vergleich zwischen Wachstumskurve und Toxinmenge bei den 2 Stämmen scheint dafür zu sprechen, daß die Vermehrungstendenz des einzelnen Stammes für die Toxinproduktion nicht ausschlaggebend ist und auch die in das Nährsubstrat mit dem Inoculum eingebrachte Keimmenge die Toxinbildung nicht wesentlich beeinflußt.

Die Untersuchungsergebnisse werden dahin gedeutet, daß das Toxinbildungsvermögen eine bestimmte Eigenschaft des einzelnen Stammes ist, und die verschiedenen Stämme von C. pyogenes nach dieser Eigenschaft unterschieden werden sollten. Bei den 10 für die vorliegende Arbeit verwendeten Stämmen waren die Stämme H 174, G 11 und C 56 sehr gute Toxinbildner. Sie blieben es, wenn auch etwas vermindert, als die Nährsubstrate (z.B. Todd-Hewitt-Bouillon, Lovellsche Bouillon mit Casein-Hydrolysat) nicht optimal waren. Stamm C 56 wurde aus einem Fetus isoliert und hatte ein Verkalben des Rindes verursacht. Stamm G 11 war aus einer Uterusschleimhautgeschabselprobe einer klinisch gesund erscheinenden Schlachtkuh isoliert worden und Stamm H 174 aus einer Cerumenprobe eines an Otitis externa ulcerosa erkrankten Pudels. Als mäßiger Toxinbildner kam der Stamm 899, der aus einer Pneumonielunge eines Schafes in Syrien isoliert worden war, in Betracht. Die Stämme 1546 und 1264, die aus einem Rinderfetus, bzw. aus einem Organ eines Rindes isoliert worden waren, bildeten kein Toxin, während der Stamm 1300, der aus einem Milchsekret kultiviert worden war, schlecht Toxin bildete. Die Rindertonsillenstämme T 14, T 21 und T 39 waren ebenfalls schlechte Toxinbildner.

Die Frage, ob ein gutes Toxinbildungsvermögen für eine pathogene Wirkung eines Stammes spricht, kann aufgrund der verhältnismäßig kleinen Zahl von untersuchten Stämmen nicht beantwortet werden und wäre an einer größeren Zahl von Stämmen, deren Herkunft einwandfrei feststeht, zu prüfen. Wichtig erscheint, daß aus den vorliegenden Untersuchungen hervorgeht, daß die Fähigkeit der C. pyogenes, ein hämolysierendes Toxin zu bilden, eine bemerkenswerte Eigenschaft ist und bei der Charakterisierung von Stämmen des C. pyogenes berücksichtigt werden sollte.

Zusammenfassung:

1. In Lovellscher Bouillon mit Brunnengräber-Pepton wurden von 10 untersuchten C.-pyogenes-Stämmen 3 Stämme als sehr gute Toxinbildner erkannt, 1 Stamm bildete nur mäßige Mengen Toxin, 4 Stämme waren schlechte Toxinbildner, 2 Stämme bildeten kein Toxin.

2. Durch Kultivierung der 10 Stämme in der Lovellschen Bouillon mit Bacto-Pepton, pankreatisch verdautem Casein-Hydrolysat und in der Todd-Hewitt-Bouillon konnte keine Steigerung der Toxinproduktion festgestellt werden. Die Lovellsche Bouillon mit Brunnengräber-Pepton erwies sich für eine Toxinbildung als optimaler Nährboden.

3. Thioglykolat-Bouillon war mit und ohne Rinderserumzusatz für die Toxingewinnung von C. pyogenes ungeeignet.

4. Die Menge des von den Pyogenes-Stämmen gebildeten Toxins ließ sich im Hämolysetest bestimmen. Sie reichte nur bei den guten Toxinbildnern aus, um im Letalitätstest Mäuse zu töten. Die Dosis letalis minima lag zwischen 0,5 und 0,06 ml.

5. In der Lovellschen Bouillon mit Rindfleischzusatz bildeten die guten Toxinbildner bei einem pH-Bereich von 6,1 bis 7,9 ausnahmslos reichliche Mengen von Toxin. Bei einem pH-Wert von 5,4 war die Toxinproduktion bei den guten Toxinbildnern deutlich reduziert. Die schlechten Toxinbildner bildeten bei allen pH-Werten keine oder nur geringe Mengen von Toxin.

6. Die Fähigkeit der Toxinbildung ist eine Eigenschaft des einzelnen Stammes; sie ist von der Keimzahl und der Vermehrungsintensität der Keime im Nährboden unabhängig.

7. Bei einer Beschreibung der Eigenschaften der Stämme von C. pyogenes sollte zukünftig die Fähigkeit der Toxinbildung mit Berücksichtigung finden.

Literaturverzeichnis

1. Bilal, S. — Contribution a l'étude du bacille Pyogène de poels. Ann. Inst. Pasteur 40, 846 (1926)

2. Brown, J.H. u. Orcutt, M.L. — A study of Bacillus pyogenes. J. Exper. Med. 32, 219 (1920)

3. Hartwigk, H. — Untersuchungen über das Hämolysin des Corynebacterium (C.) pyogenes und seiner atypischen Variante. Zschr. Hyg. 148, 142 (1961)

4. Hartwigk, H. u. Grund, S. — Atypische Corynebakterien beim Rind. Zbl. Bakt. I Orig. 179, 499 (1960)

5. Hinz, K.-H. — Studien über das Alpha-Toxin von Clostridium welchii. Vet.-med. Diss. Berlin FU 1964

6. Jowett, W. — Bacillus pyogenes and its relation to bovine mastitis. J. Comp. Path. 38, 180 (1925)

7. Lovell, R. — Studies on Corynebacterium pyogenes, with special reference to toxin production. J. Path. Bact. 45, 339 (1937)

8. Lovell, R. — Studies on the toxin of Corynebacterium pyogenes. J. Path. Bact. 52, 295 (1941)

9. Lovell, R. — Further studies on the toxin of Corynebacterium pyogenes. J. Path. Bact. 56, 525 (1944)

10. Marbé, M. u. Olariu, A. — Formule simplifiée pour la production d'une toxine diphtérique puissante et de valeur antigénique élevée. Compt. rend. Soc. biol. 118, 1673 (1935)

11. Matthews, P.R.J. u. Derbyshire, J.B. — Observations on the mouse lethal power and serology of Corynebacterium pyogenes
Res. Vet. Sci. 4, 531 (1963)

12. Merchant, J.A. — A study of the Corynebacteria associated with diseases of domestic animals
J. Bact. 30, 95 (1935)

13. Parvanta, M.F. — Zur Frage der aktiven Immunisierung mit Vaccinen von Corynebacterium pyogenes
Vet.-med. Diss. München 1962

14. Ryff, J.F. u. Browne, J. — Corynebacterium pyogenes - a cultural and serological study
Amer. J. Vet. Res. 15, 617 (1954)

15. Topley u. Wilson, G.S. — Principles of bacteriology and immunity
4. Ed. Vol. 1, S. 557
London: Arnolds 1955

16. Weitz, B. — Studies on C. pyogenes antitoxin in relation to immunity
J. Comp. Path. 57, 279 (1947)

17. Weitz, B. u. Landridge, R. — Studies on C. pyogenes antitoxin in relation to immunity
J. Comp. Path. 57, 286 (1947)

18. Wildführ, G. — Zur Frage der Toxinsteigerung durch Kultur- und Tierpassagen bei Stämmen aus der Gruppe der Gasoedemerreger
Zschr. Hyg. 130, 521 (1949/50)

19. Wildführ, G. — Über die Toxinbildung der Gasoedemerreger im Kulturversuch und in synthetischen Nährsubstraten
Zbl. Bakt. I. Orig. 154, 272 (1949)

20. The Oxoid manual of culture media, incl. ingredients and other laboratory services
2. ed. Reprint.
London: The Oxoid Division
Oxo Limited 1962

Herrn Prof. Dr. H. Hartwigk möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir jederzeit gewährte großzügige und freundliche Unterstützung herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Angestellten des Institutes für die mir jederzeit gewährte Hilfe.

Lebenslauf:

Am 23. 8. 1938 wurde ich als erste Tochter des Rechtsanwaltes Kurt Sauer und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Munk, in Leipzig geboren.

Bis zum Jahre 1952 besuchte ich in Leipzig die Grundschule. Aufgrund eines beruflich bedingten Umzuges meiner Eltern nach Kleinmachnow, Kr. Potsdam Land, beendete ich dort die Grundschule und besuchte bis zum Jahre 1957 die Oberschule Kleinmachnow, die ich am 6. 7. 1957 mit dem Reifezeugnis verließ.

Am 10. 11. 1958 wurde ich an der Freien Universität Berlin immatrikuliert und studierte bis zum Sommersemester 1959 Wirtschaftswissenschaften.

Im Wintersemester 1959/60 begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Veterinärmedizin, bestand im Jahre 1961 das Physikum und am 16. 11. 1964 das Staatsexamen.

Seit dem 16. 11. 1964 bin ich im Institut für Veterinär-Hygiene im Rahmen eines Forschungsvorhabens beschäftigt.